Original Article / Özgün Makale

MEDICINE PALLIATIVE CARE

DOI: 10.47582/jompac.737218
J Med Palliat Care 2020; 1(3): 49-52

Türkiye'de yetişen *Teucrium polium L.* bitkisinin HepG2 hücre hattı üzerindeki etkisi

Effect of *Teucrium polium L.* plant on HepG2 cell line grown in Turkey

Duygu Kırkık[1], Nur Pınar Sancak[2], Jalal MM Alragabi[3]

[1]Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
[2]Medipol Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilim, İstanbul, Türkiye
[3]Yenikent Aile Sağlık Merkezi, Aile Hekimliği, İstanbul, Türkiye

Cite this article as/Bu makaleye atıf için: Kırkık D, Sancak NP, Alragabi JMM. Türkiye'de yetişen *Teucrium polium L.* bitkisinin HepG2 hücre hattı üzerindeki etkisi. J Med Palliat Care 2020; 1(3): 49-52.

ÖZ

Giriş: Bazı bitkiler yüzyıllardır tıbbi amaç için kullanılmaktadır. Gastrointestinal bozukluklar, inflamasyon ve diyabet gibi bazı patolojik durumlar için İranlılar ve Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi tarafından kullanılan en popüler bitkilerden biri *Teucrium polium L.* 'dir. Literatürde *Teucrium polium L.* bitkisinin toksisite seviyesini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada amaç; Türkiye'de yetişen *Teucrium polium L.* bitkisinin HepG2 hücre hattı üzerindeki etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda; *Teucrium polium L.* bitkisinin toksisite seviyesini ölçmek için hücre kültürü metodu kullanılmıştır.

Bulgular: Araştırmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre; *Teucrium polium L.* bitkisi HepG2 hücre hattı üzerinde yüksek oranda toksisite göstermiştir.

Sonuç: Çalışmamızdan elde ettiğimiz bilgilere göre; insanların bilinçsizce tükettiği ürünler doğal da olsa, insan vücudunda tahribatlara, hücre ölümlerine, DNA kırıklarına neden olabilir. *Teucrium polium L.* bitkisi insanlar tarafından kullanıma uygun değildir.

Anahtar Kelimeler: HepG2, *Teucrium polium L.*, toksisite, sitotoksisite, hücre hattı

ABSTRACT

Introduction: Some plants have been used for medicinal purpose for centuries. One of the most popular plant is *Teucrium polium L.* that is used by Persian and Southeastern Anatolia Region of Turkey for many pathological situations such as gastrointestinal disturbance, inflammation and diabetes. There are no study showing the level of toxicity of the *Teucrium polium L.* in the literature. The aim of this study is to investigate the effect of *Teucrium polium L.* Plant on HepG2 Cell Line Plant Grown in Turkey.

Material and Method: To measure of the toxicity levels *Teucrium polium L.* plant, cell culture method was used.

Results: According to the results, *Teucrium polium L.* plant has shown high level of toxicity on the HepG2 cell line.

Conclusion: According to our findings, unconsciously consumed products, even if they are natural, could be destroying in human body, or causing deaths and DNA breaking. *Teucrium polium L.* plant is not suitable for human use.

Keywords: HepG2, *Teucrium polium L*, toxicitiy, cytotoxicity, cell line

Corresponding Author / Sorumlu Yazar: Duygu Kırkık, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Selimiye, Tıbbiye Cd. No: 38, 34668, Üsküdar, İstanbul, Türkiye
E-mail / E-posta: dygkirkik@gmail.com
Received / Geliş: 14.05.2020 **Accepted / Kabul:** 04.07.2020

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

GİRİŞ

Günümüzde birçok bitki; potansiyel terapötik etkisi olan, kimyasal maddeleri içeren önemli kaynaklar olarak kabul edilmektedir. Halk dilinde peryavşan olarak bilinen *Teucrium polium L.* insanlar tarafından tıbbi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Lamiaceace familyasının *Teucrium* cinsinin 300 türünden biridir (1). *Teucrium polium L.*; 20-50 cm yüksekliğinde, sapsız, dikdörtgen ya da doğrusal yaprakları olan bir çalıdır ve hemen hemen tüm Akdeniz ülkelerinin, Güney Batı Asya, Avrupa ve Kuzey tepelerinin ve çöllerinin taşlık yerlerinde yetişmektedir ve en çok İran'da bulunmaktadır (2,3). Fitokimyasal araştırmalar, *Teucrium polium L.'nin* içeriğinde terpenoidler, flavonoidler, iridoidler gibi çeşitli bileşikleri içerdiğini vurgulamaktadır (4). *Teucrium polium L.* geleneksel İran tıbbında karın ağrısı, hazımsızlık, soğuk algınlığı ve ürogenital gibi bir çok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (5). Özellikle *Teucrium polium L.'nin* kurutulmuş formu Güney İran'da diyabetik hastalar tarafından, anti-diyabetik çay olarak tüketilmekte olup (6) ve Akdeniz ülkelerinde gastrointestinal bozukluklar, enflamasyon, diyabet gibi çeşitli patolojik durumlar için kullanılmaktadır (5,7). Ayrıca bir çalışmada antibakteriyel, antiülser, hipotansif, antispazmodik, anoreksik ve antipiretik ajan olduğu da gösterilmiştir (8-10). Son zamanlarda, *Teucrium polium L.'nin* etanol ve sulu ekstraktlarının sitotoksik, antikanser ve antimutagenik etkileri, çeşitli hücre dizileri üzerinde araştırılmaktadır (11-13). *Teucrium polium L.* ile yapılan çalışmalar arasında Suudi Arabistan'daki biyoçeşitliliği gösteren (14), anti-viral (15) ve antibakteriyel özelliğini anlatan (16) ve ayrıca bu bitkinin akciğer ve böbreğe etkisini gösteren çalışmalar da mevcuttur (17). Bir çok hastalığa şifa olduğu düşünülen *Teucrium polium L.*'nin; karaciğere etkisini gösteren herhangi bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu çalışmada amaç; Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin Gaziantep yöresinden toplanan *Teucrium polium L.'nin* HepG2 hücre hattında toksisitesinin araştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Tüm prosedürler etik kurallara ve Helsinki İlkeler Bildirgesi'ne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada immortal hücre hattı kullanılmıştır ve herhangi bir etik kurul raporu gerektirmemektedir.

Kuru Bitki Ekstraksiyonu için Kullanılan Kimyasallar

Kuru bitki kullanılan kloroform Sigma Aldrich/USA firmasından temin edilmiştir. İzopropanol, Merck/Germany firmalarından sağlanmıştır. *Teucrium polium L.* Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin Gaziantep yöresinden temin edilmiştir.

Kuru Bitkinin Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon solüsyonu 65°C'ye kadar ısıtıldı. Kurutulmuş otlar, ısıtılan ekstraksiyon solüsyonu içerisine yerleştirildi. Daha sonra 50 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Falkon tüp sıvı nitrojenle dondurulduğu ve içerisine havanla dövülen *Teucrium polium L.* alındı ve 15 dakika 65°C'de bekletildi. 24:1 v/v oranında kloroform eklendi ve yavaşça karıştırıldı ve ardından 15 dakika 200 x g oda sıcaklığında santrifüj edildi ve santrifüj sonrası supernatant başka bir falkona transfer edildi. Ardından üzerine tekrar 24:1 v/v oranında kloroform eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 15 dakika 200 x g oda sıcaklığında santrifüj edildi. Supernatant kısmı alındı ve üzerine 6 ml izopropanol eklendi, ardından -20°C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örnek; 8500 x g'de 10 dakika santrifüj edildi ve supernatantı başka bir falkona aktarıldı. Örnek 3 gün inkübe edildi ve 2 kez %70'lik etanolle yıkandı (18).

Hücre Kültürü Çalışmaları için Kullanılan Kimyasallar

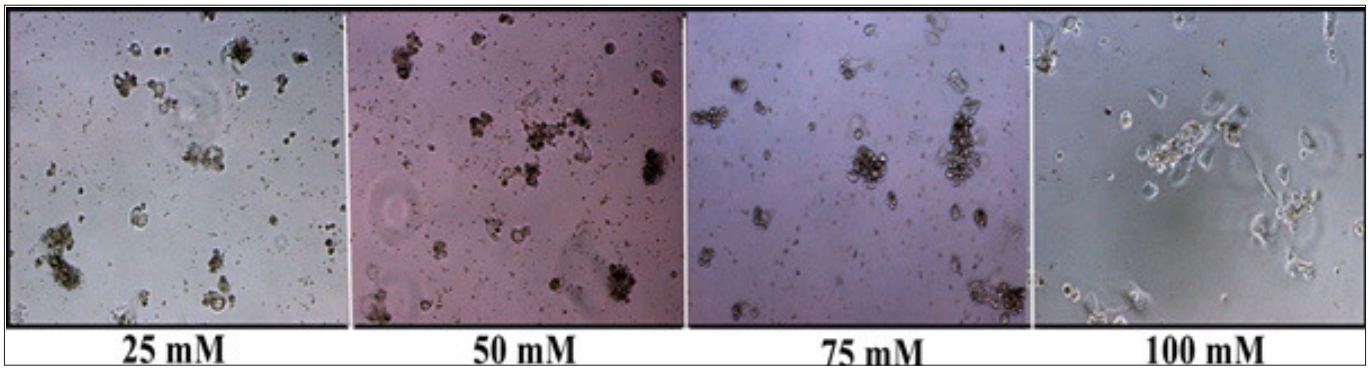
Hücre kültüründe kullanılan hücre mediumu (DMEM with4.5 g/L Glucose with L-Glutamine), FBS (Fetal Bovine Serum), Penisilin Streptomisin Wisent, USA/Canada ve HepG2 hücresi Fatih Üniversitesi'nden temin edildi. Tripan Blue solüsyonunun temini Sigma Aldrich firmasından sağlandı.

HepG2 Hücrelerinin Pasajlanması, Hücre Ekimi ve WST-1 Testi

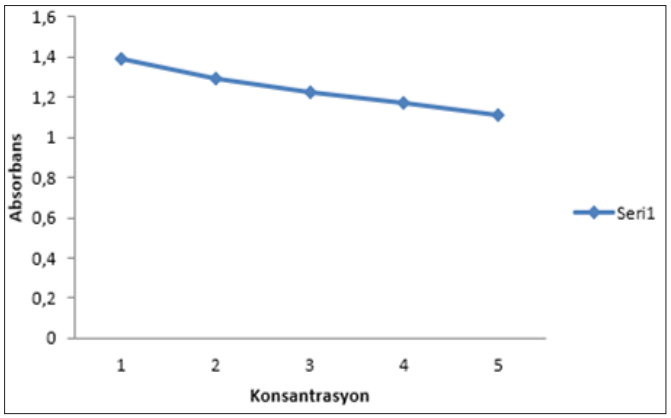
Mikroskop altında incelenen, yapıştığı ve çoğaldığı görüntülenen hücrelerin mediumu atıldı ve yıkamak için üzerine 5mL 1X'lik PBS eklendi. Yapışık hücre tabakasını kaldırmak için 1,2 mL tripsin eklendi ve 37°C'de 2-3 dakika inkübe edildi. %10 FBS olacak şekilde 5 mL DMEM eklendi ve hücreler falkon tüpe transfer edildi. 2000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edilen hücrelerin supernatant kısmı atıldı ve pellet 5 mL DMEM yardımıyla çözüldü. Çözülen hücrenin 20 µL'si mikroskop altında sayım yapmak için ayrıldı ve hücrelerin geri kalanı 75 cm^2 flask içerisine ekim yapıldı. Hücreler 37°C, %5 CO_2 inkübatöre konuldu ve 2 günde bir aynı işlem tekrarlandı. WST-1 testi için 96 kuyucuklu plate kullanıldı ve 2 kontrol olmak üzere toplam 10 kuyucuk kulanıldı ve pasaj işleminden hemen sonra sayılan hücreler, her kuyuya 10.000 hücre olacak şekilde, paylaştırıldı. Kuyucuk başına 100 µL hücre ekimi yapıldı. Ekilen hücreler, tutunması için 24 saat inkübe edildi ve inkübe sonrası medium atıldı ve hücrelerin üzerine 100 µL 25 mM, 50 mM, 75 mM ve 100mM konsantrasyonları belirlenen örnekten eklendi ve hücreler 24 saat inkübe edildi. İnkubasyon sonrası hücrelerin üzerine 10 µL WST-1 eklendi ve birer saat aralıklarla spektrofotometre cihazı ile ölçüm alındı (19).

BULGULAR

Çalışmamızda canlı hücreler üzerindeki toksisite etki miktarı WST-1 testi yapılarak gösterilmiştir. 25 mM, 50 mM, 75 mM ve 100 mM konsantrasyonlarda kullanılan *Teucrium polium L.* ekstraktının HepG2 hücrelerinde sitotoksisite ölçümü yapılmış ve faz kontrat mikroskobu yardımıyla görüntüsü alınmıştır (**Şekil**). Hücrelerin sağ kalım oranı **Grafik**'te gösterilmiştir.



Şekil. Farklı konsantrasyonlarda kullanılan *Teucrium polium L.* ekstraktına maruz kalan HepG2 hücrelerinin faz kontrast mikroskobuyla alınmış görüntüleri



Grafik. Farklı konsantrasyonlarda *Teucrium polium L.* ekstraktı ile muamele edilen HepG2 hücrelerinin sağ kalım sonuçlarını gösteren WST-1 sonuçları

TARTIŞMA

Çeşitli ağır metaller ve metaloid elementlerin insanlar üzerinde, sağlık açısından olumsuz etkilerini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Ağır metaller ve metaloid elementler; endokrin bozulması (20), sitotoksisite (21), mitokondriyal disfonksiyon (22) ve oksidatif stres (23,24) gibi birçok soruna neden olabilir, metabolik homeostazı bozabilir ve hastalıklara neden olabilir. Literatürde; ağır metallere ve metaloidlere maruziyet sonucu karsinogenez (25), insülin direnci (26), nörodejenerasyon (27) ve bağışıklıklığın bozulması (28,29) gibi bir çok hastalığın geliştiği gösterilmiştir. Ağır metaller, metaloidler gibi toksik özellik gösteren maddeler, insan vücuduna farklı şekillerde girebilir. Örneğin; günümüzde *Teucrium polium L.* içerisinde bulunan yağ ve metanolik ekstresi özelliği sayesinde; insanlar tarafından gastrointestinal bozuklukların, enflamasyonun (5,7) ve diyabetin (6) giderilmesi için çay olarak tüketilmektedir. Türkiye'nin Gaziantep yöresinden temin edilen *Teucrium polium L.* bitkisinin literatürde antibakteriyel ya da antiviral özellik gösterdiği bilinmektedir (16). Ancak; çalışmamızda HepG2 besiyeri ortamına *Teucrium polium L.* bitkisinin özütü eklendikten sonra, hücre hattında kontaminasyon ve sitotoksisite meydana geldiği görülmüştür. Bununla birlikte; 25 mM, 50 mM, 75 mM ve 100 mM konsantrasyonlarında kullanılan *Teucrium polium L.* bitki özütünün, HepG2 hücre hattında toksik etkiye sebep olarak, hücrelerin formunu bozduğu gözlemlenmiştir. Bu sebeple; çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler neticesinde; *Teucrium polium L.* bitki özütünün uzun süreli kullanımda insan vücudunda birçok tahribata yol açabileceğini düşünmekteyiz.

SONUÇ

Günümüzde birçok kişi; "doğal" ürünlerin onlar için her zaman güvenli ve iyi olduğuna inanmaktadır. Bu kesinlikle doğru değildir. Tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin, insan vücudu üzerinde bir etkisi vardır ancak doğru miktarda kullanılmadığında potansiyel olarak vücutta toksik etki yapma potansiyeli de oldukça yüksektir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bilgilere göre; insanların bilinçsizce kullandığı ürünler doğal da olsa, insan vücudunda tahribatlara, hücre ölümlerine, DNA kırıklarına neden olabilir. Bu sebeple tüketilen ürünün kullanılmadan iyice araştırılması gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı yapmak için laboratuvarını açan Doç. Dr. Mustafa Fatih Abasıyanık'a teşekkür ederiz.

ETİK BEYANLAR

Etik Kurul Onayı: Bu çalışmada immortal hücre hattı kullanılmıştır ve herhangi bir etik kurul raporu gerektirmemektedir.

Aydınlatılmış Onam: Bu çalışmada immortal hücre hattı kullanıldığı ve insan çalışması olmadığı için yazılı onam gerektirmemektedir.

Hakem Değerlendirme Süreci: Harici çift-kör hakem değerlendirmesi.

Çıkar Çatışması Durumu: Yazarlar bu çalışmada herhangi bir çıkara dayalı ilişki olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışmada finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Yazar Katkıları: Yazarların tümü; makalenin tasarımına, yürütülmesine, analizine katıldıklarını ve son sürümünü onayladıklarını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. El Oualidi J, Verneau O, Puech S, Dubuisson JY. Utility of rDNA ITS sequences in the systematics of *Teucrium* section *polium* (lamiaceae). Plant Syst Evol 1999; 215: 49–70.
2. Feinbrun-Dothan N. Flora Palaestina, Part three. Israel Acad Sci Hum 1970; 3: 101–6.
3. Tapeh NG, Bernousi I, Moghadam AF, Mandoulakani BA. Genetic diversity and structure of Iranian *Teucrium* (*Teucrium polium L.*) populations assessed by ISSR markers. J. Agr Sci Tech 2018; 20: 333-45.
4. Piozzi F, Bruno M, Rosselli S, Maggio A. Advances on the chemistry of furano-diterpenoids from *Teucrium* genus. Heterocycles 2005; 65: 1221–34.
5. Abdollahi M, Karimpour H, Monsef-Esfehani HR. Antinociceptive effects of *Teucrium polium L.* total extract and essential oil in mouse writhing test. Pharm Re 2003; 48: 31–5.
6. Esmaeili MA, Yazdanparast R. Hypoglycaemic effect of *Teucrium polium*: studies with rat pancreatic islets. J Ethnopharmacol 2004; 95: 27–30.
7. Tariq M, Ageel AM, al-Yahya MA, Mossa JS, al-Said MS. Anti-inflammatory activity of *Teucrium polium*. Int J Tissue React 1989; 11: 185–8.
8. Autore G, Capasso F, De Fusco R, et al. Antipyretic and antibacterial actions of *Teucrium polium*. Pharmacol Res Commun 1984; 16: 21–9.
9. Gharaibeh MN, Elayan HH, Salhab AS. Anorexic effect of *Teucrium polium* in rats. Int J Crude Drug Res. 1989; 27: 201–7
10. Suleiman MS, Abdul-Ghani AS, Al-Khalil S, Amin R. Effect of *Teucrium polium* boiled leaf extract on intestinal motility and blood pressure. J Ethnopharmacol 1988; 22: 111–6.
11. Khader M, Bresgen N, Eckl PM. Antimutagenic effects of ethanolic extracts from selected Palestinian medicinal plants. J Ethnopharmacol 2010; 127: 319–24.
12. Khader M, Eckl PM, Bresgen N. Effects of aqueous extracts of medicinal plants on MNNG-treated rat hepatocytes in primary cultures. J Ethnopharmacol 2007; 112: 199–202.
13. Nematollahi-Mahani SN, Rezazadeh-Kermani M, Mehrabani M, Nakhaee N. Cytotoxic effects of *Teucrium polium* on some established cell lines. Pharm Biol 2007; 45: 295–8
14. Bukhari NA, Al-Otaibi RA, Ibhrahim MM. Biodiversity characteristics of *Teucrium polium* species in Saudi Arabia. Saudi J Biol Sci 2015; 22: 2: 181-5.
15. Ansari M, Sharififar F, Arabzadeh AM, et al. In vitro evaluation of anti-herpes simplex-1 activity of three standardized medicinal plants from Lamiaceae. Anc Sci Life 2014; 34:1- 33-8.
16. Purnavab S, Ketabchi S, Rowshan V. Chemical composition and antibacterial activity of methanolic extract and essential oil of Iranian *Teucrium polium* against some of phytobacteria. Nat Prod Res, 2015; 29:14: 1376-9.
17. Rafieian KM, Nasri H, Baradaran A, *Teucrium polium*: Liver and kidney effects. J Res Med Sci 2014; 19: 478-9.
18. Atki YE, Aouama I, Kamaria FE, Badia AT, Oumokhtar LB, Abdellaoui A. Phytochemistry, antioxidant and antibacterial activities of two Moroccan *Teucrium polium L.* subspecies: preventive approach against nosocomial infections. Arab J Chem 2020; 13: 2: 3866-74.
19. Machana S, Weerapreeyakul N, Barusrux S, Nonpunya A, Sripanidkulchai B, Thitimetharoch T. Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line. Chin Med 2011; 31: 6: 39.
20. World Health Organization, "Global assessment of the state-of the-science of endocrine disruptors," Geneva, Switzerland, pp. 1–180, 2002.
21. Chen YW, Huang CF, Yang CY, Yen CC, Tsai KS, Liu HS. Inorganic mercury causes pancreatic β-cell death via the oxidative stress-induced apoptotic and necrotic pathways. Toxicol Applied Pharmacol 2010; 243: 323–31.
22. Belyaeva EA, Sokolova TV, Emelyanova LV, Zakharova IO. Mitochondrial electron transport chain in heavy metal-induced neurotoxicity: effects of cadmium, mercury, and copper. The Scientific World J 2012; 14: 2012.
23. Hu L, Greer JB, Gabriele HS, Fieber LA, Cai Y. Arsenic toxicity in the human nerve cell line SK-N-SH in the presence of chromium and copper. Chemosphere 2013; 91: 8: 1082–7.
24. Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. Current Medicinal Chemistry 2005; 12:10: 1161–208
25. Nair AR, Degheselle O, Smeets K, Van EK, Cuypers A. Cadmium-induced pathologies: where is the oxidative balance lost (or not)? Int J Molecular Sci 2013; 14: 6116–43.
26. Kolachi NF1, Kazi TG, Afridi HI, et al. Status of toxic metals in biological samples of diabetic mothers and their neonates. Biological Trace Element Research 2011; 143: 196–212.
27. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. Molecular Cellular Biochem 2010; 345: 91–104.
28. Genuis SJ. Sensitivity-related illness: the escalating pandemic of allergy, food intolerance and chemical sensitivity. The Science of the Total Environment 2010; 408: 6047–61.
29. Moszczynski P, Rutowski J, Słowi S, Bem S. Immunological effects of occupational exposure to metallic mercury in the population of T-cells and NK-cells. Analyst 1998; 123: 99–103.